



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 25 JUL 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: *Invenzione Industriale*
N. MI2003 A 000860



*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, II

12 MAG. 2004

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

Giampietro Carlotta

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Residenza BOLOGNA

2) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Residenza PARMA

codice 0113171

codice 00308780345

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Fabrizio TANSINI - Albo n. 697 BM et al.

denominazione studio di appartenenza BUGNION S.p.A.

via Lancetti

n. 17

città MILANO

cap 20158

(prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

METODO PER L'INIBIZIONE SELETTIVA DEL GENE N-cyc UMANO TRAMITE ACIDI PEPTIDI NUCLEICI (PNA) ANTISENDO E ANTIGENE IN TUMORI CON ESPRESSIONE DI N-cyc

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

E. INVENTORI DESIGNATI

1) TONELLI Roberto

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

2) PESSION Andrea

3) FRONZA Raffaele

cognome nome

4) SFORZA Stefano

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

1)

2)

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

La titolarità e proprietà del brevetto è registrata: 70% UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA e 30% UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA per accordi esistenti fra le parti

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 1

PROV

n. pag. 17

Doc. 2) 1

PROV

n. tav. 02

Doc. 3) 2

RIS

Doc. 4) 1

RIS

Doc. 5) 0

RIS

Doc. 6) 0

RIS

Doc. 7) 0

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

CENTODOTTANTOTTO/51

COMPILATO IL 29/04/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

p.i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA - UNIVERSITA'

CONTINUA SI/NO SI

Fabrizio TANSINI - Albo n. 697 BM - DEGLI STUDI DI PARMA

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 000860

Reg. A.

codice 1155

L'anno DUEMILATRE

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto per invenzione industriale, depositata in data 1000 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopralportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

A. RICHIEDENTE (I)

<input type="checkbox"/>	Denominazione	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA	N.G.
<input type="checkbox"/>	Residenza	BOLOGNA	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	codice 01131710376
<input type="checkbox"/>	Residenza	PARMA	codice 00308780345
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
0.5 CORRADINI Roberto	0.6 MARCHELLI Rosangela
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE
					Data N° Protocollo
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) p.i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA-UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Fabrizio TANSINI - Albo n. 697 BM

NUMERO DOMANDA M12003A000860

REG. A

DATA DI DEPOSITO

29/04/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

METODO PER L'INIBIZIONE SELETTIVA DEL GENE N-myc UMANO TRAMITE ACIDI PEPTIDICI
NUCLEICI (PNA) ANTISENSENTO E ANTIGENE IN TUMORI CON ESPRESSIONE DI N-myc

L. RIASSUNTO

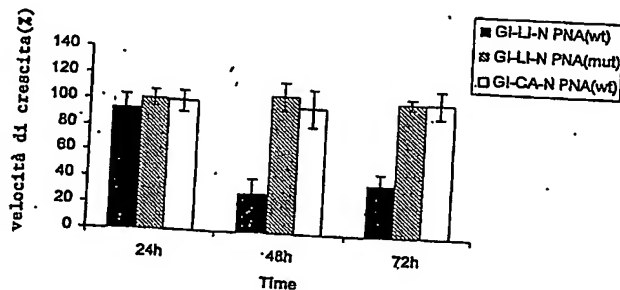


RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce ad acidi nucleici peptidici (PNA) senso ed antisenso. Inoltre, la presente invenzione si riferisce all'impiego di detti PNA per la preparazione di farmaci per il trattamento delle malattie genetiche.

M. DISEGNO

FIGURA 1



DESCRIZIONE

annessa a domanda di brevetto per BREVETTO D'INVENZIONE dal titolo:
 "METODO PER L'INIBIZIONE SELETTIVA DEL GENE N-myc
 UMANO TRAMITE ACIDI PEPTIDO NUCLEICI (PNA) ANTISENSENTO E
 ANTIGENE IN TUMORI CON ESPRESSIONE DI N-myc "

A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA, di nazionalità
 italiana con sede a BOLOGNA (titolare al 70%) e
 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA di nazionalità
 italiana con sede a PARMA (titolare al 30%)

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti iscritto all'Albo con il n. 7BM, Ing.
 Carlo Raoul Ghioni iscritto all'Albo con il n. 280 BM, Ing.
 Martino Salvadori iscritto all'Albo con il n. 438 BM, Fabrizio
 Tansini iscritto all'Albo con il n. 697 BM, Ing. Antonio Nesti
 iscritto all'Albo con il n. 792 BM Ing. Gianmarco Ponzellini
 iscritto all'Albo con il n. 901 BM, Ing. Luigi Tarabbia iscritto
 all'Albo con il n. 1005 B, della BUGNION S.p.A. domiciliati
 presso quest'ultima in MILANO - Viale Lancetti 17.

Depositata il

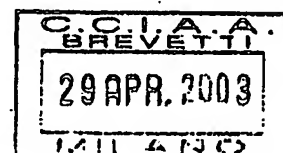
al n°

MI 2003 A 0 00860

La presente invenzione si riferisce ad acidi nucleici peptidici (PNA) senso ed
 antisenso. Inoltre, la presente invenzione si riferisce all'impiego di detti PNA
 per la preparazione di farmaci per il trattamento delle malattie genetiche.

E' noto che la strategia antisenso costituisce un valido mezzo per il trattamento
 di malattie genetiche o malattie provocate da virus.

La strategia antisenso prevede che una porzione di RNA complementare ad una



regione di RNA trascritto di un gene sia in grado di bloccare l'espressione del RNA trascritto attraverso la formazione di un legame tra DNA complementare e RNA trascritto al fine di prevenire la traduzione di RNA trascritto.

In pratica, piccole sequenze di DNA comprendenti 15-25 basi di lunghezza sono sintetizzati in forma complementare e vengono combinati con porzioni di specifici mRNA di virus o di origine dannosa presenti in cellule tumorali.

Le porzioni complementari così costruite sono in grado di bloccare direttamente la traduzione.

Inoltre, è noto l'impiego della strategia antisense per la preparazione di farmaci antisense impiegati nella terapia genetica umana.

È noto l'impiego di strutture antisense quali ad esempio gli oligonucleotidi.

Tuttavia, negli ultimi anni, si è sviluppato l'impiego di nuove strutture antisense ed antigene quali gli acidi nucleici peptidici (PNAs).

Gli acidi nucleici peptidici (PNAs) comprendono analoghi degli acidi nucleici aventi carica neutra contenenti una catena (backbone) pseudopeptidica al posto di una usuale struttura deossiribosio-fosfato.

Gli acidi nucleici peptidici (PNAs) sono enzimaticamente più stabili se confrontati con le strutture antisense oligonucleotidiche.

Gli acidi nucleici peptidici possono legarsi in maniera complementare a filamenti di DNA/RNA dando luogo a una struttura ibrida PNA/DNA o PNA/RNA doppia elica i quali sono più stabili termodinamicamente rispetto alle "homoduplexes".

Inoltre, gli acidi nucleici peptidici possono essere sintetizzati impiegando tecniche di sintesi normalmente impiegate per la sintesi dei peptidi.

Alla luce dei vantaggi sopra espressi, gli acidi nucleici peptidici (PNAs)

rappresentano un approccio alternativo per la terapia genica antisenso e sono il sistema più vantaggioso per la strategia antigene.

Inoltre, è stato dimostrato che gli acidi nucleici peptidici presentano una elevata specificità per le sequenze bersaglio e consentono di inibire l'espressione delle
5 proteine.

Pertanto, gli acidi nucleici peptidici (PNAs) costituiscono un promettente approccio terapeutico per il trattamento di malattie geniche o provocate da virus.

Tuttavia, gli acidi nucleici peptidici (PNAs) presentano un inconveniente, come le strutture antisenso oligonucleotidiche, costituito dal fatto che presentano una
10 debole capacità di attraversamento della membrana cellulare.

Per superare tale inconveniente, alcuni studiosi hanno tentato di coniugare gli acidi nucleici peptidici con specifiche molecole al fine di aumentare l'efficacia della penetrazione degli acidi nucleici peptidici al passaggio della membrana cellulare.

15 Inoltre è noto che circa il 25-30% di neuroblastomi non trattati presentano un'amplificazione/iperespressione del proto-oncogene *N-myc* la quale è associata con uno stadio avanzato della malattia, rapida progressione e prognosi sfavorevole.

Un neuroblastoma è un sarcoma originato dal sistema nervoso periferico ed è costituito da neuroblasti; (cellule embrionali che si trasformeranno in cellule
20 nervose).

Il neuroblastoma colpisce bambini fino a 10 anni e provoca metastasi craniche ed epatiche.

L'espressione di *N-myc* in topi transgenici causa lo sviluppo di neuroblastomi.

25 L'inibizione antisenso dell'espressione di *N-myc in vitro* diminuisce la



proliferazione di neuroblastoma e promuove la differenziazione delle cellule tumorali di neuroblastoma.

L'inibizione è stata sino ad oggi accompagnata sia da strutture oligonucleotidiche antisense contro N-myc mRNA che dall'espressione di vettori progettati a generare RNA antisense N-myc.

Tuttavia, gli antisense oligonucleotidici presentano l'inconveniente dovuto al fatto che sono rapidamente degradati dalle nucleasi.

Pertanto, l'identificazione di inibitori selettivi di NMYC (proteina) potrebbe essere di notevole importanza per lo sviluppo di agenti terapeutici specifici meno tossici e più efficienti per trattare i neuroblastomi con N-myc espressione.

Di conseguenza, rimane la necessità di poter disporre di sequenze di PNA in grado di inibire o eliminare la sintesi della proteina NMYC prodotta in tumori che presentano un'espressione di tale proteina.

In particolare, rimane la necessità di poter disporre di sequenze di PNA, eventualmente coniugabili, da poter essere impiegate nella strategia antisense ed antigene al fine di inibire o eliminare la sintesi della proteina NMYC.

In particolare, rimane la necessità di poter disporre di sequenze di PNA antisense e PNA antigene da poter essere utilizzati nella preparazione di farmaci (farmaci antisense e farmaci antigene) di elevata specificità ed efficacia per il trattamento di malattie genetiche o causate da virus patogeni.

In particolare, rimane la necessità di poter disporre di selezionati acidi nucleici peptidici in grado di poter legare mRNA messaggero

Uno scopo della presente invenzione è quello di progettare e selezionare sequenze di PNA in grado di attraversare la membrana cellulare.

Ulteriore scopo della presente invenzione è quello di progettare e selezionare

sequenze di PNA per l'impiego nella strategia antisenso.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di progettare e selezionare sequenze di PNA per l'impiego nella strategia antigene.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di progettare e selezionare sequenze di PNA per inibire selettivamente la proteina NMYC; ad esempio nelle
5 cellule di neuroblastoma umane.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di progettare e selezionare sequenze di PNA di elevata specificità ed efficacia per la preparazione di farmaci antisenso e farmaci antigeni idonei nel trattamento di malattie
10 genetiche.

Questi scopi ed altri ancora, che risulteranno chiari dalla descrizione dettagliata che segue, sono stati risolti dalla Richiedente la quale propone una strategia antisenso ed una strategia antigeni basate sull'impiego di specifici acidi nucleici peptidici (PNAs) per inibire la sintesi della proteina NMYC nei tumori che
15 esprimono tale proteina in particolare nelle cellule di neuroblastoma umano.

Pertanto, forma un primo oggetto della presente invenzione sequenze di PNA aventi le caratteristiche come riportate nella unità rivendicazione indipendente.

Forma un altro oggetto della presente invenzione un procedimento per la preparazione delle sequenze di PNA le cui caratteristiche sono riportate nella
20 unità rivendicazione indipendente.

Forma un altro oggetto della presente invenzione l'impiego di dette sequenze di PNA per la preparazione di farmaci antisenso e farmaci antigeni per il trattamento di malattie genetiche le cui caratteristiche sono riportate nella unità rivendicazione indipendente.

25 Altre forme di realizzazione preferite sono riportate nelle unità rivendicazioni

indipendenti senza limitare l'oggetto della presente invenzione.

In una forma di realizzazione preferita la Richiedente impiega delle sequenze di PNA per inibire selettivamente la proteina NMYC nelle cellule di neuroblastoma umane.

5 Per dimostrare l'efficacia degli acidi nucleici peptidici selezionati dalla Richiedente, la stessa ha eseguito prove sperimentali selezionando quattro linee cellulari di neuroblastoma: GI-LI-N, IMR-32 dove il gene N-myc è amplificato e superespresso; e GI-CA-N, GI-ME-N dove il gene N-myc non è amplificato e non è espresso.

D 10 Sorprendentemente, la Richiedente ha trovato che gli acidi nucleici peptidici antisense selezionati dalla Richiedente, sono in grado di attraversare la membrana cellulare delle cellule senza l'impiego di un carrier.

Inoltre, la Richiedente ha sorprendentemente trovato che l'effetto di inibizione, causato dai PNA antisense e antigene, sulla sintesi della proteina NMYC è
15 altamente selettivo e specifico e comporta un effetto antiproliferativo.

Inoltre, l'arresto della crescita di cellule GI-LI-N di neuroblastoma umano aventi il gene N-myc amplificato, dopo l'utilizzo dei PNA antisense, è direttamente seguito da differenziazione cellulare o apoptosi (morte programmata delle cellule).

D 20 Vantaggiosamente, l'acido nucleico peptidico (PNA) comprende da 12 a 24 basi nucleotidiche. Detto acido nucleico peptidico è complementare al filamento senso o al filamento antisense del gene N-myc umano.

In una prima realizzazione, l'acido nucleico peptidico è complementare al filamento senso del gene N-myc umano ed è denominato PNA antisense.

25 In una seconda realizzazione, l'acido nucleico peptidico è complementare al

filamento antisenso del gene N-myc umano ed è denominato PNA senso.

La Richiedente ha progettato un acido nucleico peptidico PNA antisenso (bp 135-150: 5'-TCCACCCAGCGCGTCC-3', genbank accession number M13241) complementare ad un'unica sequenza nella regione 5'-UTR del gene N-myc per inibire un attacco con il ribosoma.

Al fine della valutazione della specificità dell'attività del PNA antisenso, un PNA mutato contenente la sostituzione di tre basi è stato disegnato (5'-CCCACTCAGCGCGCCC-3')

Il PNA antisenso o senso può essere coniugato con un vettore in grado di attraversare la membrana nucleare delle cellule bersaglio ovvero delle cellule tumorali che esprimono il gene N-myc.

Il PNA antisenso coniugato con un vettore mostra attività PNA antigene. Tra i PNA antigene quelli che si legano al filamento antisenso del gene N-myc sono denominati PNA antigene senso mentre quelli che si legano al filamento senso del gene N-myc sono denominati PNA antigene antisenso.

I PNA antigene senso hanno mostrato una particolare efficacia nei confronti di cellule bersaglio.

La Richiedente ha progettato anche sequenze PNA antigene senso ed PNA antigene antisenso (antigene senso: bp: 1650-1665 5'-ATGCCGGGCATGATCT-3'; antigene antisenso: 5'-AGATCATGCCCGGCAT-3' genbank accession number M13241) complementari ad una sequenza dell'esone 2 del gene N-myc. Dette sequenze sono state coniugate in 3' con un segnale di localizzazione nucleare (NLS) derivante dal virus SV40, per favorire l'attraversamento della membrana nucleare. Il vettore è costituito da una sequenza peptidica PKKKRKV.



In una realizzazione preferita, i PNA antisenso ed i PNA antigene senso o antigene antisenso, oggetto della presente invenzione, sono impiegati nella preparazione di composizioni farmaceutiche.

Di seguito viene riportata, a solo titolo esemplificativo, una metodologia di sintesi per acidi peptido nucleici (PNA) oggetto della presente invenzione su scala 10 micromolare, purificazione e caratterizzazione:

50 mg di resina polistirenica funzionalizzata con gruppi metilbenzidrilamminici (MBHA-PS) vengono trattati con diclorometano (DCM) per 1 ora al fine di provocare il rigonfiamento della resina stessa. La resina è quindi lavata con 5% diisopropiletilammina (DIPEA) in dimetilformammide (DMF), DCM, ancora 5% DIPEA in DMF e N-metilpirrolidone (NMP). A parte si prepara una soluzione contenente 0.01 mmoli del primo monomero C-terminale di PNA N-Boc protetto (commercialmente disponibili) in 125 microlitri di NMP, 0.0095 mmoli di benzotriazoliluronio esafluorofosfato (HBTU) in 125 microlitri di NMP e si mescolano insieme le due soluzioni. Si aggiungono 0.02 mmoli di DIPEA e si lascia attivare per 2 minuti, quindi si pone la soluzione contenente il monomero attivato a contatto con la resina. Si lascia reagire per 1 ora, quindi si lava la resina più volte con NMP. I siti non reagiti vengono bloccati con una soluzione di anidride acetica/piridina/DMF in rapporto 1:2:2 messa a contatto con la resina per 1 ora. Si controlla l'assenza di siti reattivi con un Kaiser test. Nel caso di Kaiser test non negativo si ripete la procedura di blocco. La resina viene lavata quindi più volte con NMP, quindi con 5% DIPEA in DMF, quindi con DCM. A questo punto la resina porta legato il primo monomero C-terminale in rapporto 0.2 mmoli/grammo.

La procedura di allungamento della catena prevede, per ogni monomero da

inserire, un ciclo costituito dai seguenti passaggi: deprotezione del gruppo Boc, preattivazione e coupling, blocco degli eventuali siti non reagiti (capping). Tali cicli vengono in genere eseguiti mediante sintetizzatore automatico (Applied Biosystem ABI 433A). Le soluzioni utilizzate per i vari passaggi sono riportate di seguito. Deprotezione: acido trifluoroacetico (TFA) / m-cresolo 95:5; preattivazione e coupling: 0.05 mmoli del monomero di PNA N-Boc protetto e 0.048 mmoli di HBTU sciolti in 500 microlitri di NMP e addizionati di 0.1 mmoli di DIPEA; capping: anidride acetica:piridina:NMP 1:25:25. I PNA rodaminati sono stati sintetizzati utilizzando una molecola spaziatrice (acido Boc-amminoetossietossiacetico) al penultimo ciclo al posto del monomero di PNA e rodamina all'ultimo ciclo al posto del monomero di PNA.

I PNA così sintetizzati sono stati staccati dalla resina mediante una soluzione di acido trifluorometansolfonico (TFMSA): TFA: m-cresolo: tioanisolo 2:6:1:1 e precipitati con aggiunta di etere etilico alla soluzione di distacco.

I PNA grezzi così ottenuti sono stati analizzati mediante LC-MS (colonna analitica C18 250x4.6 mm, eluizione a gradiente tra acqua addizionata di 0.2% acido formico e una soluzione acqua:acetonitrile 60:40 addizionata di 0.2% acido formico, flusso 1ml/min. Detector UV a 260 nm e detector di massa in modalità di ionizzazione positiva, range 150-1500 m/z). La purificazione è stata effettuata utilizzando un sistema analogo a quello analitico ma utilizzando una colonna semipreparativa (250x10mm). L'identità del composto puro è stata sempre confermata mediante spettrometria di massa. Tipica resa dopo purificazione: 30%. Tipica purezza dopo purificazione 90-95%.

Per valutare l'abilità dei PNA antisenso e dei PNA antigene a penetrare nelle cellule di neuroblastoma umano e per analizzare la successiva localizzazione

intracellulare, la Richiedente ha impiegato quattro linee cellulari GI-LI-N e IMR-32, GI-CA-N e GI-ME-N e le ha trattate per tempi compresi da 30 minuti a 24 ore con 20 μM di PNA antisenso o senso coniugati con rodamina in 5'. Inoltre i PNA antigene erano coniugati con NLS in 3'.

5 L'immagine microscopica fluorescente mostra che la fluorescenza intracitoplasmatica per il PNA antisenso 5'-UTR (nelle linee cellulari GI-LI-N e GI-CA-N) e intranucleare per i PNA antigene (nelle linee cellulari GI-LI-N e GI-ME-N) è già misurabile dopo 30 minuti dal trattamento delle cellule con il PNA. L'intensità massima è raggiunta a 6 ore dopo le quali il livello rimane costante per 24 ore.

Elevati valori intracitoplasmatici del PNA antisenso furono osservati. Mentre, per PNA antigene furono osservati elevati valori intranucleari..

Cellule non trattate mostrano solo una fluorescenza intracellulare "background" dopo sei ore.

15 Per valutare l'efficacia e la specificità degli acidi nucleici peptidici selezionati dalla Richiedente, la stessa ha utilizzato le quattro linee cellulari sopra descritte. In esperimenti in triplicato usando piastre contenenti 24 pozzetti, 1.0×10^5 cellule sono state inserite nei primi pozzetti con 0.5 ml di RPMI1640 contenenti 10% di FBS e 2 mM di L-butanina.

20 Le cellule sono state incubate per 24 ore a permettere l'aderenza alla base dei pozzetti.

Successivamente, per valutare la concentrazione ottimale di inibizione della crescita cellulare, l'acido nucleico peptidico è stato aggiunto alle cellule GI-LI-N a concentrazioni di 10, 20, 40 e 60 μM per il PNA antisenso 5'-UTR, mentre per i PNA antigene senso e antisenso a concentrazioni di 1, 2, 5, 10 e 20 μM sulle

cellule GI-LI-N e IMR-32.

Per valutare la specificità e selettività dell'effetto degli acidi nucleici peptidici sulla proteina NMYC, le cellule GI-LI-N sono state trattate con una variante dell'acido nucleico peptidico antisense 5'-UTR con incorporate tre punti di mutazione ad una concentrazione di 20 μ M (concentrazione ottimale selezionata per tale PNA) e le cellule GI-CA-N (che non presentano un'amplificazione del gene N-myc) sono state trattate con PNA antisense 5'-UTR ad una concentrazione di 20 μ M.

Per valutare la specificità dei PNA antigene senso ed antisense, le cellule GI-ME-N e GI-CA-N (in cui il gene N-myc non è amplificato e non è espresso) sono state trattate con PNA antigene senso ed antisense ad una concentrazione di 10 μ M (concentrazione ottimale selezionata per il PNA antigene senso).

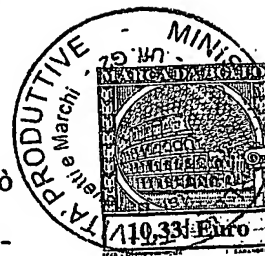
Successivamente, per valutare gli effetti dei trattamenti, le cellule sono state raccolte e contate dopo 24, 48 e 72 ore dal trattamento.

La conta delle cellule e la vitalità delle stesse è stata determinata impiegando in metodo di esclusione colorimetrico (tryphan blue dye).

Il trattamento con PNA antisense 20 μ M in cellule GI-LI-N aventi l'espressione del gene N-myc amplificata mostra consistente inibizione della crescita cellulare. L'effetto di inibizione massimo è del 70% ed è raggiunto 48 ore dopo trattamento (fig. 1).

In contrasto, cellule di neuroblastoma GI-CA-N aventi l'espressione del gene N-myc non amplificato e che non esprimono N-myc non mostrano effetti di inibizione negli esperimenti realizzati sotto le stesse condizioni (fig. 1).

Gli esperimenti di proliferazione sulle GI-LI-N usando un PNA antisense contenente una sequenza alterata mediante l'introduzione di tre punti di



mutazione, non hanno evidenziato alcun effetto di inibizione (fig. 1). Ciò dimostra l'azione selettiva e specifica del PNA antisenso per la sequenza 5'-UTR del trascritto di N-myc.

La produzione di NMYC (proteina) fu valutata mediante l'impiego del Western Blotting nella linea cellulare GI-LI-N dopo trattamento con PNA antisenso 20 μ M a 24, 48 e 72 ore. Una marcata riduzione del livello di proteina dopo 48 ore è stata registrata. Tale riduzione si attenua dopo 72 ore.

Un'analisi citometrica di flusso condotta sulle cellule GI-LI-N a 36 ore dopo il trattamento con 20 μ M di PNA antisenso mostra che tale PNA induce un accumulo di cellule in G_0/G_1 da 34% a 57% e diminuisce in G_2 e nella fase S da 13 a 6 % e da 53% a 37% rispettivamente.

Inoltre, il numero di cellule nella fase sub- G_1 con un contenuto di DNA ipodiploico (presenza di cromosomi in numero inferiore a quello diploide, cioè 2n) aumenta da 3 al 22%.

Per valutare la differenziazione nelle cellule GI-LI-N verso cellule di tipo neuronale la stessa linea cellulare è stata trattata con PNA antisenso a 20 μ M e cambi morfologici sono stati osservati mediante l'impiego di analisi microscopica.

La valutazione al microscopio è stata condotta dopo 36 e 48 ore dalla coltivazione delle cellule GI-LI-N in presenza o in assenza di PNA antisenso a 20 μ M.

Dopo 36 ore le cellule trattate sono meno uniformemente distribuite rispetto alle cellule di controllo e dopo 48 ore è stata osservata la tendenza a formare aggregati cellulari in piccoli ammassi.

Nessun effetto di inibizione della crescita è stato registrato delle cellule GI-CA-

N ma, al contrario, detti effetti sono stati registrati negli esperimenti condotti sulle cellule GI-LI-N.

Vantaggiosamente, i PNA oggetto della presente invenzione mostrano un alto grado di selettività per il target disegnato sulla sequenza 5'-UTR N-myc.

5 PNA antigene: il trattamento con PNA antigene senso 10 μ M in cellule GI-LI-N e IMR-32 aventi l'espressione del gene N-myc amplificata causa consistente inibizione delle crescita cellulare.

Infatti, l'effetto di inibizione massimo è del 90% in cellule GI-LI-N ed 80% in cellule IMR-32 ed è raggiunto a 48 ore dopo trattamento (fig. 2; C(a) e D(b)).

10 In contrasto, cellule di neuroblastoma GI-ME-N e GI-CA-N aventi il gene N-myc non amplificato e non espresso non mostrano effetti di inibizione negli esperimenti realizzati sotto le stesse condizioni (fig. 2; E(c)).

Gli esperimenti di proliferazione sulle GI-LI-N ed IMR-32 usando il PNA antigene antisenso a 10 μ M non hanno evidenziato effetti di inibizione (fig. 2; 15 C(x) e D(y)). Ciò dimostra che l'azione del PNA antigene senso è selettiva e specifica per il filamento antisenso del gene N-myc, e che probabilmente l'azione di inibizione della trascrizione si esercita tramite l'arresto dell'RNA polimerasi che utilizza come stampo proprio il filamento antisenso.

20 La produzione del trascritto di N-myc fu valutata prima e dopo 48 ore di trattamento con PNA antigene senso 10 μ M mediante amplificazione in PCR di cDNA ottenuto da 250 ng di mRNA di cellule GI-LI-N. I seguenti primers sono stati utilizzati: senso CGACCACAAGGCCCTCAGT (Esone 2, bp 2366); antisenso TGACCACGTCGATTTCTTCCT (Esone 3, bp 5095)(Genbank M13241). La PCR è stata effettuata con 30 cicli di reazione. I risultati hanno 25 mostrato che nelle cellule GI-LI-N trattate con PNA antigene senso il prodotto di

PCR relativo al trascritto di N-myc non è rilevabile, mentre è ben rilevabile nelle cellule non trattate.

Vantaggiosamente, i PNA antigene oggetto della presente invenzione sono altamente specifici per N-myc amplificazione / overespressione.

5 La presenza di una amplificazione / overespressione del gene N-myc è la caratteristica maggiore che distingue le linee cellulari GI-LI-N, IMR-32 dalle GI-ME-N e GI-CA-N.

10 Nessun effetto di inibizione della crescita è stato registrato delle cellule GI-ME-N e GI-CA-N ma, al contrario, detti effetti sono stati registrati negli esperimenti condotti sulle cellule GI-LI-N e IMR-32.

Vantaggiosamente, i PNA antigene oggetto della presente invenzione mostrano un alto grado di selettività per il target disegnato sulla sequenza dell'esone 2 di N-myc.

15 Infatti, il PNA antigene senso ha notevole effetto inibitorio, interferendo direttamente con la RNA polimerasi durante la trascrizione nel filamento antisenso, mentre il PNA antigene antisenso complementare, ha un effetto molto più ridotto, probabilmente dovuto solo all'interferenza sterica con il complesso delle proteine della trascrizione.

20 I PNA oggetto della presente invenzione mostrano interesse per lo sviluppo di farmaci basati su PNA per specifici trattamenti e neuroblastomi che presentano una espressione della proteina N-MYC.

25 Tali PNA possono anche essere impiegati per altri tipi di tumori associati con una espressione della proteina N-MYC quali ad esempio retinoblastoma, medulloblastoma, neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma o tumore a piccole cellule del polmone.

RIVENDICAZIONI

1. Un acido nucleico peptidico (PNA) comprendente da 12 a 24 basi nucleotidiche detto acido nucleico peptidico essendo complementare al filamento senso o al filamento antisenso del gene N-myc umano.
- 5 2. L'acido nucleico peptidico (PNA) secondo la rivendicazione 1, in cui il PNA antisenso (5'-TCCACCCAGCGCGTCC-3') è un'unica sequenza complementare alla regione 5'-UTR del gene N-myc umano.
3. L'acido nucleico peptidico (PNA) secondo la rivendicazione 1, in cui il PNA è coniugato con un vettore in grado di attraversare la membrana nucleare delle cellule bersaglio che esprimono il gene N-myc.
- 10 4. L'acido nucleico peptidico (PNA) secondo la rivendicazione 3, in cui il PNA coniugato è un PNA antigene senso o un PNA antigene antisenso.
5. L'acido nucleico peptidico (PNA) secondo la rivendicazione 4, in cui il PNA antigene senso o il PNA antigene antisenso (5'-ATGCCGGGCATGATCT-3'; antigene antisenso: 5'-AGATCATGCCCCGGGCAT-3') sono
15 complementari ad una sequenza dell'esone 2 del gene N-myc.
6. L'acido nucleico peptidico (PNA) secondo la rivendicazione 3, in cui il PNA antigene senso o il PNA antigene antisenso sono coniugati in 3' con un segnale di localizzazione nucleare (NLS) derivante dal virus SV40 (sequenza peptidica PKKKRKV).
- 20 7. Una composizione farmaceutica comprendente un acido nucleico peptidico PNA in accordo ad almeno una delle rivendicazioni da 1 a 6.
8. Uso di un acido nucleico peptidico PNA in accordo ad almeno una delle rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di una composizione
25 farmaceutica per il trattamento di malattie genetiche.

Fabrizio Tansini
Albo Prot. n. 697 BM



9. Uso di un acido nucleico peptidico PNA in accordo alla rivendicazione 8 per la preparazione di una composizione farmaceutica per il trattamento di tumori associati ad una espressione della proteina N-MYC.

10. Uso di un acido nucleico peptidico PNA in accordo alla rivendicazione 8 o 9 per la preparazione di una composizione farmaceutica per il trattamento di tumori quali neuroblastoma, retinoblastoma, medulloblastoma, glioblastoma, astrocitoma o tumore a piccole cellule del polmone.

p. i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

IL MANDATARIO
FABRIZIO TANSINI
Albo Prot. n. 697 BM

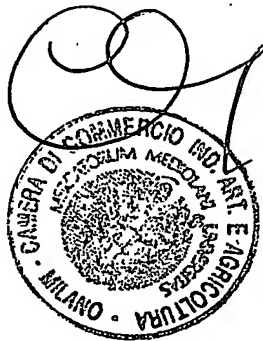
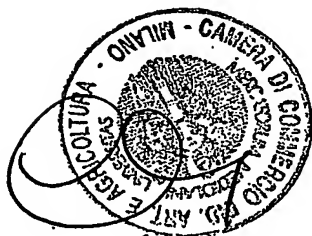
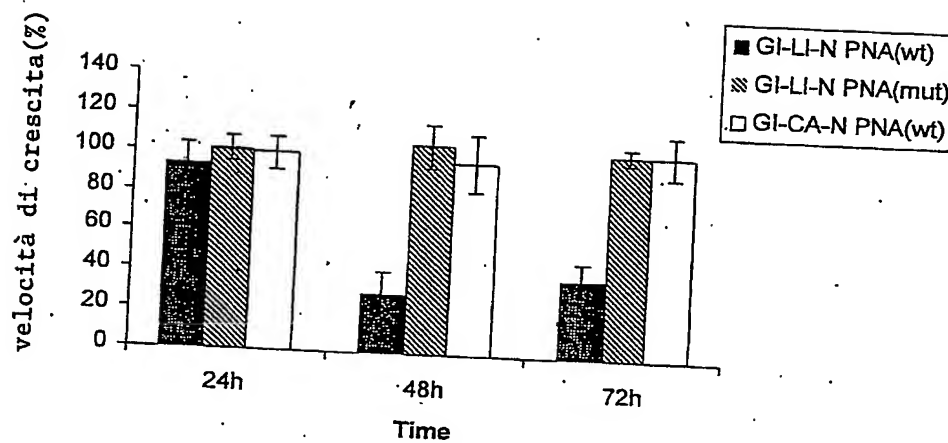


FIGURA 1

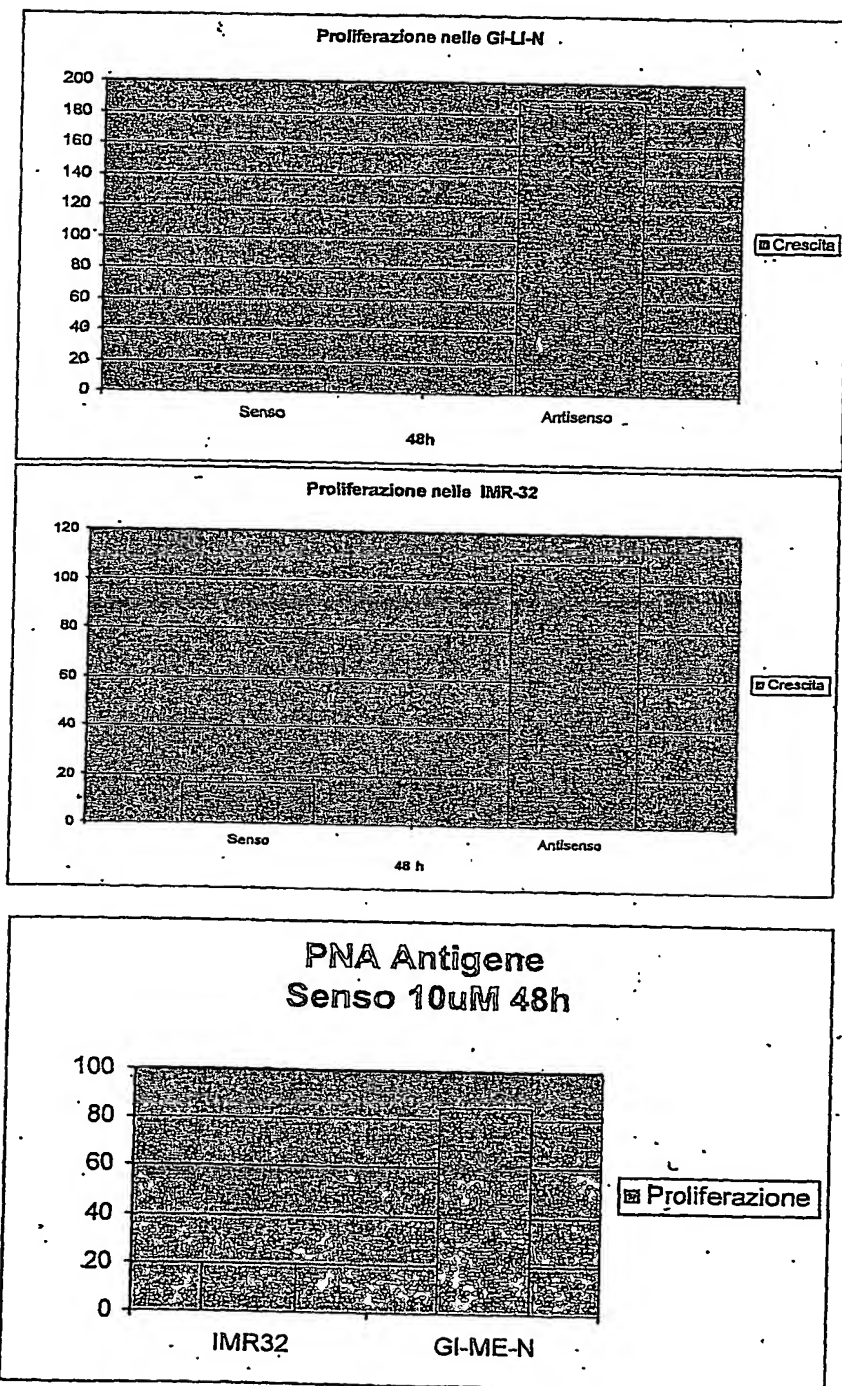


MI 2003A 000860

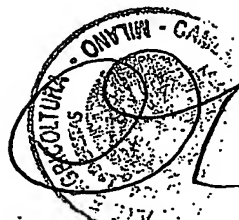
p.i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA e della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

IL MANDATARIO
Fabrizio TANSINI
 Iscritto all'Albo con il n. 697 BM

FIGURA 2



MI 2003 A 000860



p.i. della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA e della UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

IL MANDATARIO
 Fabrizio TAVENI
 Iscritto all'Albo con il n. 697 BM

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.